



Kit per la determinazione della bilirubina diretta nel siero o plasma Metodo colorimetrico Jendrassik-Grof modificato

PRINCIPIO

La bilirubina diretta (o "coniugata") reagisce, in ambiente acido, con l'acido solfanilico diazotato formando un azocomposto colorato (azobilirubina) la cui intensità di colore è proporzionale alla concentrazione di bilirubina diretta nel campione esaminato.

REATTIVI - Concentrazione iniziale

R1 Acido solfanilico 25.0 mmol/l; tensioattivi
R2 Sodio nitrito 0.32 mmol/l

CAMPIONI

- Siero o plasma anticoagulato con EDTA-Na₂.

Note

- Non utilizzare campioni emolizzati.
- Poiché la bilirubina è un pigmento fotosensibile, tenere i campioni lontani da fonti di luce e di calore. Processare immediatamente i campioni.
- Per campioni non limpidi e iperlipemici si consiglia di allestire un bianco campione.

VALORI DI RIFERIMENTO

Adulti: fino a 0.35 mg/dl (5.1 µmol/l)

I valori di riferimento sono da considerarsi indicativi in quanto ogni laboratorio dovrebbe ricercare quelli della popolazione su cui opera. I risultati del test dovrebbero essere interpretati unitamente alle informazioni derivanti dalle valutazioni cliniche del paziente.

CONSERVAZIONE E STABILITÀ

- Conservare il kit a 15-25°C. Non congelare i reattivi.
- Dopo l'apertura, i flaconi **R1** e **R2** sono stabili fino alla data di scadenza indicata se richiudi immediatamente dopo il prelievo, protetti da contaminazione, evaporazione, luce diretta e conservati alla temperatura corretta.
- Stabilità della soluzione di lavoro (**R1+ R2**): 21 giorni a 2-8°C.

PREPARAZIONE DEI REATTIVI

I reattivi sono liquidi e pronti all'uso. Per l'utilizzo come monoreattivo (procedimento "campione starter") aggiungere ogni 4 ml del reattivo **R1** 1 ml del reattivo **R2**. Preparare in questo modo un quantitativo pari al fabbisogno stimato tenendo presente la stabilità del reattivo di lavoro.

NOTE

- Il kit con la presente metodica deve essere utilizzato in manuale. Per l'utilizzo in automatico consultare le applicazioni specifiche.
- Valutare attentamente i risultati se l'estinzione del reattivo di lavoro è > 0.100 a 570 nm.
- Evitare di esporre i reattivi alla luce diretta, contaminazione ed evaporazione.
- I volumi indicati nel procedimento possono essere variati proporzionalmente.
- In caso di reclamo o di richiesta del controllo di qualità del presente kit, indicare il numero di lotto riportato sulla confezione o, in alternativa, il numero di lotto dei singoli componenti.

MATERIALI AUSILIARI

Materiali necessari non contenuti nel kit: soluzioni diluenti, vetreria e monouso, sistemi di dosaggio e misurazione, calibratori per la taratura degli strumenti.

CONTROLLO DI QUALITÀ

È necessario eseguire i controlli ad ogni utilizzo del kit e verificare che i valori ottenuti siano inclusi nell'intervallo di riferimento riportato nelle istruzioni d'uso.

Sieri consigliati:

REF 20350 Precise Norm REF 20360 Precise Path

PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

Il prodotto non è classificato come sostanza pericolosa (DLg. N.285 art.28 Legge n.128 del 1998). La concentrazione totale dei componenti è inferiore ai limiti riportati dalle Direttive 67/548/CEE e 88/379/CEE e successive modifiche sulla classificazione, imballaggio ed etichettatura delle sostanze pericolose.

È consigliabile tuttavia maneggiare il prodotto con cautela secondo le norme di buona pratica di laboratorio.

Si raccomanda di utilizzare provette monouso e vetreria lavata con HCl 1N e acqua distillata.

SMALTIMENTO RIFIUTI

Il prodotto deve essere smaltito secondo le locali normative in materia di gestione dei rifiuti.

PROCEDIMENTO

Lunghezza d'onda λ: 570 (550-580) nm
 Temperatura di lavoro 37°C
 Cammino ottico 1 cm
 Tipo di reazione "end point"

- PROCEDIMENTO MONOREATTIVO "campione starter"

	BIANCO	CAMPIONE
REATTIVO DI LAVORO	1500 µl	1500 µl
ACQUA DISTILLATA	100 µl	--
CAMPIONE	--	100 µl

Agitare e poi incubare 5 min. a 37°C. Leggere l'estinzione del campione (EC) e del bianco (EBC) contro acqua.

- PROCEDIMENTO BIREATTIVO "substrato starter"

	BIANCO	CAMPIONE
REATTIVO R1	1000 µl	1000 µl
ACQUA DISTILLATA	80 µl	--
CAMPIONE	--	80 µl

Mescolare, incubare per 5 min., poi aggiungere:

REATTIVO R2	250 µl	250 µl
-------------	--------	--------

Agitare e poi incubare 5 min. a 37°C. Leggere l'estinzione del campione (EC) e del bianco (EBC) contro acqua.

CALCOLO

$$\text{Bilirubina diretta [mg/dl]} = (\text{EC} - \text{EBC}) \times 14.5$$

$$[\mu\text{mol/l}] = (\text{EC} - \text{EBC}) \times 248$$

FATTORE DI CONVERSIONE

$$\text{Bilirubina [mg/dl]} \times 17.0 = \text{Bilirubina } [\mu\text{mol/l}]$$

PRESTAZIONI DEL REATTIVO

Interferenze

I trigliceridi non interferiscono sino alla concentrazione di 500 mg/dl.
 L'emoglobina non interferisce sino alla concentrazione di 1000 mg/dl.

Linearità

La reazione è lineare tra 0.049-10 mg/dl (0.83-170 µmol/l). Campioni superiori a 10 mg/dl devono essere diluiti con soluzione fisiologica. Moltiplicare il risultato per il fattore di diluizione.

Precisione "intra-Assay" (NELLA SERIE)

Determinata su 30 replicati per ciascun controllo (N-H) (Normal-High). Risultati ottenuti:

MEDIA	[mg/dl]	N = 0.30	H = 1.10
D.S.		0.03	0.06
C.V.%		8.20	5.72

Precisione "inter-Assay" (FRA LE SERIE)

Determinata su 15 replicati per ciascun controllo (N-H) per 3 giorni. Risultati ottenuti:

MEDIA	[mg/dl]	N = 0.21	H = 1.25
D.S.		0.06	0.05
C.V.%		3.58	3.73

Sensibilità analitica

Soglia di sensibilità espressa dal metodo: 0.049 mg/dl (0.83 µmol/l).

Correlazione

Un metodo equivalente preso a riferimento, correlato su 21 campioni con il reattivo in esame, ha dato un fattore di correlazione **r = 0.99**

BIBLIOGRAFIA

Jendrassik, L., Gróf, P., Biochem. Z., 297, 81 (1938).
 Tiez, N.W., Textbook of Clinical Chemistry. W.B. Saunders Co (1983).
 Fossati, P., Ponti, M., Principe, L., Tarengi, G., Clin. Chem., 35, 173 (1989).
 Kaplan, LA, Pesce, A.J.: "Clinical Chemistry", Mosby Ed. (1996).

SIMBOLOGIA



Consultare istruzioni per l'uso



Marchio CE (prodotto conforme ai requisiti della Dir. 98/79/CE)



Limiti temperatura di conservazione



Dispositivo medico-diagnostico in vitro



Fabbricante



Kit for measurement of direct bilirubin in serum or plasma Colorimetric method Jendrassik-Grof modified

PRINCIPLE

Direct (or conjugate) bilirubin reacts, in acid environment, with diazotised sulphaniic acid giving a coloured azocompound (azobilirubin) whose colour intensity is proportional to the direct bilirubin concentration in the tested sample.

REAGENTS

R1 Sulphanilic acid 25.0 mmol/l; surface-active agents
R2 Nitrite sodium 0.32 mmol/l

SAMPLE

- Serum or EDTA-Na₂ plasma.

Note

- Do not use samples with haemolysis.
- Keep the samples far from light and heat because the bilirubin is a photosensitive pigment. Perform the samples as soon as possible.
- It's advisable to perform a blank sample for those samples which are hyperlipoeemic and not clear.

REFERENCE VALUES

Adults: up to 0.35 mg/dl (5.1 µmol/l)

References values are considered indicatives since each laboratory should establish references ranges for its own patient's population. The analytical results should be evaluated with other information coming from patient's clinical story.

STORAGE AND STABILITY

- Store the kit at 15-25°C. Do not freeze the reagents.
- After opening, the vials **R1** and **R2** are stable up to the expiry date if recapped immediately and protected from contamination, evaporation, direct light, and stored at the correct temperature.
- Working solution stability (**R1**+ **R2**): 21 days at 2-8°C.

PREPARATION OF REAGENTS

Reagents are liquid and ready to use. About using as monoreagent ("sample-starter" procedure) add to every 4 ml of **R1** reagent, 1 ml of **R2** reagent. Prepare the amount for use according to the stability of working solution.

NOTE

- The kit, according to this method, must be used in manual procedures. About automatic using follow specific applications.
- Evaluate carefully the results if working reagent absorbance is > 0.100 at 570 nm.
- Avoid direct light, contamination and evaporation.
- The volumes in the procedure can be changed proportionally.
- In case of complaint or quality control request, refer to the lot number on the package or the lot number on the singles vials.

AUXILIARY EQUIPMENT

Materials not included in the kit: diluent solutions, laboratory glassware, disposable tips, photometers and calibrators.

QUALITY CONTROLS

It's necessary, every time the kit is used, to make the quality controls and to check that values obtained are within the acceptance range provided in the insert.

Suggested serum:

REF 20350 Precise Norm REF 20360 Precise Path

PRECAUTION IN USE

The product is not classified as dangerous (DLg. N. 285 art. 28 l. n. 128/1998). The total concentration of components is lower than the limits reported by 67/548 and 88/379 CE Regulations (and following modifications) about classification, packaging and labelling of dangerous substances.
However the reagent should be handled with caution, according to good laboratory practice.
It's recommended to use disposable test tubes and glassware washed by HCl 1N and distilled water.

WASTE MANAGEMENT

Please refer to the local legal requirements.

PROCEDURE

Wavelength λ: 570 (550-580) nm
Working temperature 37°C
Optical path 1 cm
Reaction "end point"

- MONOREAGENT PROCEDURE "sample starter"

	BLANK	SAMPLE
WORKING REAGENT	1500 µl	1500 µl
DISTILLED WATER	100 µl	--
SAMPLE	--	100 µl

Mix, then incubate for 5' at 37°C. Measure the final absorbance of sample (EC) and blank (EBC) against water.

- BIREAGENT PROCEDURE "substrate starter"

	BLANK	SAMPLE
REAGENT R1	1000 µl	1000 µl
DISTILLED WATER	80 µl	--
SAMPLE	--	80 µl

Mix, incubate for 5' and then add:
REAGENT R2 250 µl 250 µl
Mix, then incubate for 5' at 37°C. Measure the final absorbance of sample (EC) and blank (EBC) against water.

CALCULATION

$$\begin{aligned} \text{Direct bilirubin [mg/dl]} &= (\text{EC} - \text{EBC}) \times 14.5 \\ [\mu\text{mol/l}] &= (\text{EC} - \text{EBC}) \times 248 \end{aligned}$$

CONVERSION FACTOR

$$\text{Bilirubin [mg/dl]} \times 17.0 = \text{Bilirubin } [\mu\text{mol/l}]$$

ANALYTICAL PERFORMANCES

Interferences

Triglycerides do not interfere up to concentration of 500 mg/dl.
Hemoglobin does not interfere up to concentration of 1000 mg/dl.

Linearity

Reaction is linear between 0.049-10 mg/dl (0.83-170 µmol/l). Samples with values exceeding 10 mg/dl must be diluted with saline solution. Multiply, then, the result for diluting factor.

"Intra Assay" precision (within-Run)

Determined on 30 samples for each control (N-H) (Normal-High).
Results:

MEAN	[mg/dl]	N = 0.30	H = 1.10
S.D.		0.03	0.06
C.V.%		8.20	5.72

"Inter Assay" precision (between-Run)

Determined on 15 samples for each control (N-H) for 3 days.
Results:

MEAN	[mg/dl]	N = 0.10	H = 1.25
S.D.		0.06	0.05
C.V.%		3.58	3.73

Analytical sensitivity

The test sensitivity in terms of detection limit is 0.049 mg/dl (0.83 µmol/l).

Correlation

A study based comparing this method with a similar method on 21 samples has given a correlating factor **r = 0.99**

BIBLIOGRAPHY

Jendrassik, L., Gróf, P., Biochem. Z., 297, 81 (1938).
Tiez, N.W., Textbook of Clinical Chemistry. W.B. Saunders Co (1983).
Fossati, P., Ponti, M., Principe, L., Tarengi, G., Clin. Chem., 35, 173 (1989).
Kaplan, LA, Pesce, A.J.: "Clinical Chemistry", Mosby Ed. (1996).

SYMBOLS



Read instruction for use



CE mark (requirement of 98/79 regulation)



Storing temperature limits



In vitro medical device



Producer